通过尿蛋白质组探索两种中成药对机体的整体影响

鲍艺今[1] 潘宣圳[1] 高友鹤[1*]
[1]（北京师范大学基因工程药物及生物技术北京市重点实验室 北京 100871）

摘要：
[目的] 拟探究中药对健康大鼠尿液蛋白质组造成的影响。
[方法] 本研究分别建立两种中药（复方丹参滴丸和藿香正气口服液）的大鼠灌胃模型，收集灌胃前后的尿液，并使用液相色谱串联质谱技术（LC-MS/MS）对提取的尿蛋白进行分析，并差异蛋白进行生物学通路的分析。
[结果] 尿液蛋白质组可以反映复方丹参滴丸灌胃 14 天前后的变化，并且差异蛋白富集到的生物学通路与其治疗心血管疾病的作用机制有关，如糖酵解、脂类代谢等。
[结论] 尿液蛋白质组学可以直接系统的反映中药对机体的整体影响，提供了一种研究中药功效的新方法。
关键词：蛋白质组学；尿液；中药

Exploring the overall effects of two traditional Chinese medicines on the body by urinary proteome

Bao Yijin[1] Pan Xuanzhen[1] Gao Youhe[1*]
[1](Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, Beijing Normal University, Beijing 100871, China)

Abstract:
[Objective] To explore the effect of traditional Chinese medicine on the urine proteome of healthy rats.
[Methods] In this study, Intragastric administration rat models were established by two traditional Chinese medicines (Compound Danshen Dropping Pills and Huoxiangzhengqi Oral Liquid). Urine samples were collected from rats before and after intragastric administration. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) was used to screen the urine differential proteins of rats before and after intragastric administration and analyze the biological pathway of differential proteins.
[Results] Urine proteome can reflect the changes before and after 14 days of intragastric administration of Compound Danshen Dropping Pills, and the biological pathways enriched by differential proteins are related to their mechanism of action in the treatment of cardiovascular diseases, such as glycolysis, lipid metabolism.
[Conclusions] Urine proteomics can directly and systematically reflect the overall impact of traditional Chinese medicine on the body, and provides a new method to study the efficacy of traditional Chinese medicine.
Keywords: proteomics; urine; traditional Chinese medicine

基金项目：国家重点研发计划课题（2018YFC0910202）；中央高校基本科研业务费专项资金（2020KJZX002）；北京师范大学（11100704）
作者简介：1.鲍艺今（1999.02—），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物. 2.潘宣圳，男，博士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物
通信联系人：高友鹤（1964.06—），男，教授，博士生导师，主要研究方向：尿液蛋白质组学与尿液生物标志物.E-mail: gaoyouhe@bnu.edu.cn.

引言

中药是中国医药科学的特色，也是中华民族传统文化的重要组成部分，[1]中药以其副作用小、多药组合、多靶点的特点，越来越受到当前研究的认可。[2]复方丹参滴丸（CDDP）由丹参、三七和冰片组成，[3]于 1990 年被列入中国药典，目前广泛应用于心肌缺血和其他心血管疾病背景下心绞痛的临床防治。[4]以往的研究表明，CDDP 的药理作用机制涉及抗氧化、抗炎、保护血管内皮功能，抑制血小板粘附和聚集，改善心肌纤维化，防止微循环障碍，减轻心肌损伤等。[2,5,6]藿香正气口服液（HXZQ-OL）是从藿香正气方衍生的中成药，该方剂源自中国宋代的《太平惠民和剂局方》。它常用于治疗与中医湿证有关的疾病，如急性胃肠炎此类的胃肠道疾病。[7]

中药作为中医治疗疾病的重要手段和载体，其多成分、多靶点、多层次的作用特点也同样给作用机制的研究带来了困难, 缺乏整体的系统评价和可参考的标准，阻碍了中药的现代化和国际化进程。近年来，多组学的发展为探究中药的治疗疗效及机制提供了一项科学有效的手段。组学研究对整个有机体进行研究，反映了人体在多因素相互作用下的整体状态，与中医学理论的整体观、辨证论治相一致，正逐渐成为一种有效驱动中药现代化进程的新策略，其中以蛋白质组学和代谢组学的应用最为广泛。代谢组学通过对生物体液、细胞和组织中的代谢物的分析，从而检测到生物途径的细微改变，从而探讨潜在疾病发病机制及药物作用靶点，进一步阐明药物的作用机制，[8]但目前我们对中药化学成分与代谢物变化的内在联系还尚不清楚，很难排除药物自身代谢对代谢终产物的影响。而蛋白组学从一个机体或一个组织、一个细胞等不同层次“整体”的蛋白质活动的角度来揭示机体活动的基本规律，利用蛋白质组学研究技术对中药复方进行多靶点的高通量筛选, 可以将中药复方的多组分、多靶点、多途径特点与蛋白质表达相关联，通过对蛋白层面上发生的蛋白质表达与含量变化分析来揭示机体整体功能状态的变化。与代谢组学相比，蛋白质组学主要反应机体整体对药物的反应，降低了药物本身和药物代谢的干扰。陈竺院士团队曾应用蛋白质组学研究复方黄黛片治疗急性早幼粒细胞性白血病多成分、多靶点协同作用的机制, 并用现代医学的方法阐述了中医经典的“君臣佐使”的配伍原则，[9]这一研究成果为中药复方作用机制的研究提供了范例。尿液作为一种无创且容易获得的生物液体，正逐渐成为蛋白质组学研究的理想样本。尿液不受稳态机制的调节，可以容纳和积累更多体内的变化。[10]此外，尿液蛋白质组的复杂性相对较低，更容易检测到低丰度蛋白质的变化特征，[11]具有灵敏反应机体变化的潜力。因此，尿蛋白质组可以更敏感的反映整个机体受药物影响的情况。

本研究利用动物模型探究中药对健康大鼠机体的影响，避免了个体的年龄、性别、饮食习惯的差异以及生长环境的不同等多种因素的影响，[12]收集大鼠灌胃前后的尿液进行非标记定量蛋白质组学分析，探究两种药物分别灌胃后的蛋白质组变化，为中药作用机制的研究提供了一种新方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型建立

SPF 级的雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (170−190 g) 9 只 ，购于北京维通利华实验动物技术有限公司，所有动物在标准环境（室温 22±1 ℃，湿度 65%－70%）下饲养，动物实验通过北京师范大学生命科学学院伦理委员会的审查和批准，编号：CLS-EAW-2020-034。

模型建立的方法：将 9 只大鼠随机分为 A、B 两组，A 组 5 只，B 组 4 只。A 组用复方丹参滴丸溶于生理盐水内进行灌胃操作，该药品适宜体重 60kg 左右的成年人每天的有效服用剂量为 81mg。根据人和大鼠之间按照体表面积折算的等效服药剂量比值（大鼠服药剂量约为人的 6.25 倍 mg/kg），换算出大鼠的有效服药剂量约为 8.44mg/kg——即 1.69mg/d。通过灌胃的方式保证每只大鼠服用相同剂量的药品，每日 1 次，灌胃 2 周。本实验使用自身对照，服用前收集的尿液样本即为对照组，时间记为 D0，服药 14 天后收集的尿液样本是实验组，时间记为 D14。B 组用藿香正气口服液进行灌胃操作，该药品适宜体重 60kg 左右的成年人每天的有效服用剂量为 20ml，按如上方法换算出大鼠的有效服药剂量约为 2.08ml/kg——即 0.42ml/d 。通过灌胃的方式保证每只大鼠服用相同剂量的药品，每日 1 次，灌胃 3 天。同样为自

身对照，服用前收集的尿液样本即为对照组，时间记为 D0，服药 3 天后收集的尿液样本是实验组，时间记为 D3。

1.2 尿液的收集

在服药前与服药后分别设置两个取样时间点，收集尿液样本。前一天将大鼠每个个体均单独放置在大鼠代谢笼中，过夜收集尿液 12 小时。在尿液收集期间，提供饮水但不提供食物，避免污染尿液。最终共计取样 18 份。尿液用 3000×g 离心 30 min 后放入−80 ℃冰箱保存。

1.3 尿液蛋白的提取和蛋白酶解

取出 4ml 尿样解冻，4℃，12000×g 条件下离心 30 分钟，去除细胞碎片，取上清用 3 倍体积的乙醇沉淀过夜，然后 12000g 离心 30 分钟。将蛋白沉淀重悬于裂解液（8mol/L 尿素，2 mol/L 硫脲，25mmol/L 二硫苏糖醇和 50 mmol/L Tris）。用 Bradford 法测量蛋白浓度。使用滤器辅助样品制备（FASP）方法进行尿蛋白酶解。[13]将尿蛋白加载到 10kDa 超滤管（PALL 公司）的滤膜上，用 UA（8mol/L 尿素）、0.1mol/L Tris-HCl（pH 8.5）和 25mmol/LNH_4HCO_3 溶液洗涤两次；加入 20 mmol/L 二硫苏糖醇（Dithiothreitol, DTT, Sigma）在 37℃中变性 1 小时，再与 50 mmol/L 碘乙酰胺（Iodoacetamide, IAA, Sigma）在黑暗中烷基化 30 分钟，用 UA 和 NH_4HCO_3 溶液洗涤两次，以 1：50 比例加入胰酶（Trypsin Gold, Promega, Fitchburg, WI, USA），37℃孵育过夜。过夜后离心收集酶解后的滤液即为多肽混合液。将多肽通过 HLB 柱（Waters, Milford, MA）除盐后用真空干燥仪进行抽干，置于-80℃保存。

1.4 LC-MS/MS 串联质谱分析

用 0.1%的甲酸水复溶肽段，使用 BCA 试剂盒对肽段浓度进行测定，将肽段浓度稀释至 0.5μg/μL。取每个样品 9ul 制备混合多肽样，按照说明书，使用高 pH 反相肽分离试剂盒(Thermo Fisher Scientific)进行分离。离心收集十份流出液（Fractions），使用真空干燥仪抽干后用 0.1%甲酸水复溶。以样品：iRT 为 10：1 的体积比例加入 iRT（Biognosis 公司）。每个样品（单个实验样品和十个 Fractions）取 1ug 使用 EASY-nLC1200 色谱系统(ThermoFisher Scientific, USA)进行数据采集。参数设定如下：洗脱时间 90 分钟，洗脱梯度为流动相 A：0.1%甲酸；流动相 B：80%乙腈。洗脱下来的肽段通过 Orbitrap Fusion Lumos Tribird 质谱仪（Thermo Fisher Scientific, USA）进行检测。对所有样品进行数据依赖（DIA）质谱数据采集，每个样本重复采集两次。

1.5 数据分析

将反相色谱柱分离得到的 10 个组分进行 DDA 模式采集质谱数据，把 DDA 采集的结果导入 Proteome Discoverer 软件（版本 2.1）搜库。PD 搜库结果用于建立 DIA 采集方法，根据 m/z 分布密度计算窗口宽度和数量。将单个多肽样品进行 DIA 模式采集质谱数据。使用 Spectronaut X 软件对质谱数据进行处理和分析。导入每个样本 DIA 采集的 raw 文件进行搜库。高度可信蛋白标准为肽段 q value<0.01，采用二级肽段所有碎片离子峰面积进行蛋白定量。

1.6 统计学分析

每一个样品均进行了 2 次技术重复，将获得的数据共用于统计学分析。将灌胃前后鉴定到的尿蛋白进行对比，进行差异蛋白筛选。筛选差异蛋白的条件如下：Fold change ≥1.5 或 ≤0.67，双尾配对 t 检验的 P 值＜0.05。

1.7 随机分组分析

将 CDDP 组灌胃前（n=5）和灌胃后（n=5）共 10 个样本随机分成两组，在所有随机组合中，按照相同的筛选条件计算所有随机次数的平均差异蛋白数目。HXZQ-OL 组同上操作。

1.8 生物信息学分析

使用悟空平台（https://www.omicsolution.org/wkomic/main/）进行非监督聚类分析（HCA），[14]使用 DAVID 6.8 （https://david.ncifcrf.gov/）对鉴定到的差异蛋白进行生物学过程、细胞定位和分子功能 3 个方面的功能富集分析。[15]在基于公开数据库（https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov）的报道研究中搜索了差异蛋白的功能。

2 结果与分析

2.1 尿蛋白组变化

在灌胃给药处理后，对所收集到的两组大鼠共 18 个尿液蛋白样品（灌胃前后）进行 LC—MS/MS 串联质谱分析。总共鉴定到 611 个蛋白（特异性多肽≥2 个，蛋白水平 FDR<1%），将其进行非监督聚类分析，从这些数据中，很明显可以区分 CDDP 灌胃 14 天前后的样品，然而并不能显著区分 HXZQ-OL 灌胃 3 天前后的样品。图 1 展示了具体的样本非监督聚类结果。

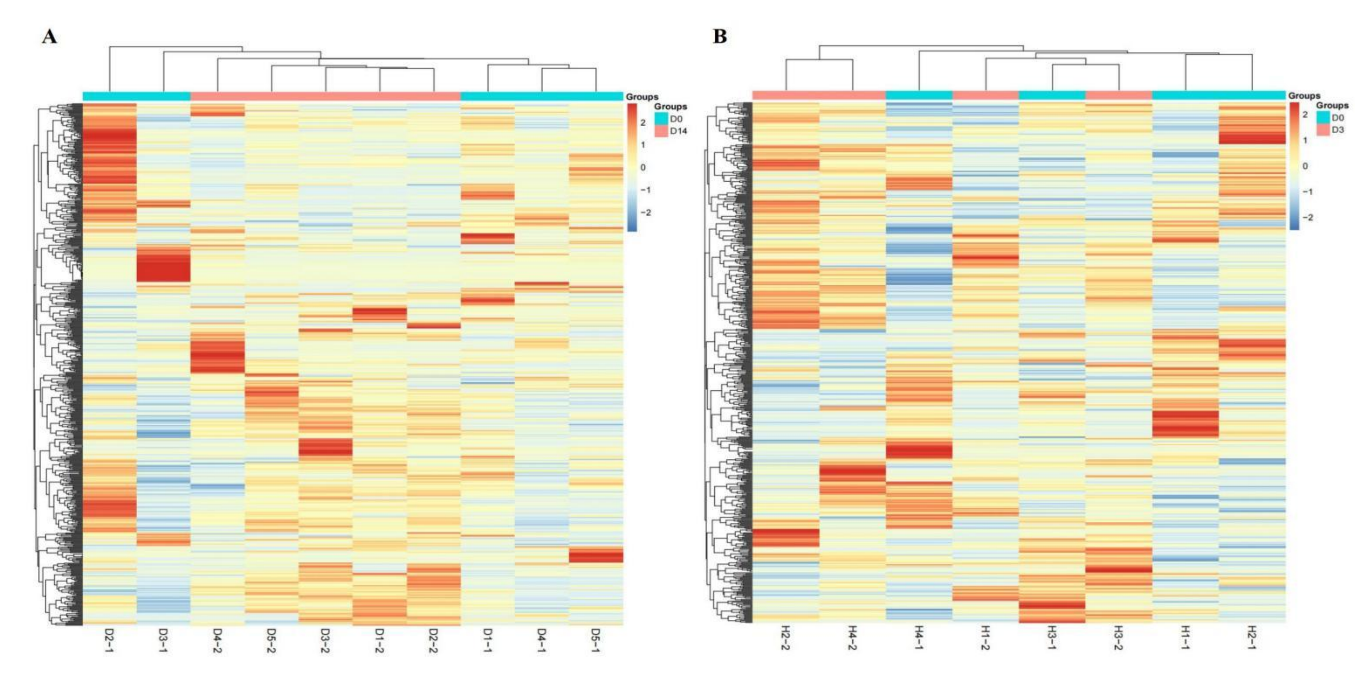


图 1 灌胃前后整体尿液蛋白质组的非监督聚类分析

Figure 1 Unsupervised cluster analysis of all proteins in control and experimental groups.
(A) CDDP group. (B)HXZQ-OL group.

对 A、B 两组大鼠灌胃后的尿液和灌胃前尿液进行比较，筛选差异蛋白的标准为：组间变化倍数 FC ≥1.5 或≤0.67，双尾配对 t 检验 $P<0.05$。结果表明，相对于灌胃给药前，灌胃给 CDDP 后鉴定到 84 个差异蛋白，灌胃给 HXZQ-OL 后鉴定到 64 个差异蛋白，差异蛋白的详细信息列于表 1（CDDP 组）和表 2（HXZQ-OL 组）。

表 1　CDDP 组鉴定到的尿液差异蛋白

Table 1　The differential proteins identified in the CDPP group .

Accession	Protein name	Trend	Fold change	P-value
P00794	Chymosin	↓	0.00	1.94E-02
P12847	Myosin-3	↓	0.00	1.43E-02
Q61233	Plastin-2	↓	0.00	2.06E-02
Q62266	Cornifin-A	↓	0.00	3.35E-02

Q8BH70	F-box/LRR-repeat protein 4	↓	0.00	2.32E-02
P08937	Odorant-binding protein	↓	0.11	2.29E-02
P42123	L-lactate dehydrogenase B chain	↓	0.52	1.84E-02
P60710	Actin, cytoplasmic 1	↓	0.40	2.11E-02
Q0PMD2	Anthrax toxin receptor 1	↓	0.62	2.96E-02
Q62635	Mucin-2 (Fragment)	↓	0.01	4.79E-02
Q63716	Peroxiredoxin-1	↓	0.66	4.86E-02
Q63751	Vomeromodulin	↓	0.33	3.29E-03
Q8VCP9	C-type lectin domain family 14 member A	↓	0.60	1.88E-02
Q9JI85	Nucleobindin-2	↓	0.17	3.98E-02
Q64573	Liver carboxylesterase 1F	↑	∞	2.16E-03
A2BIM8	Major urinary protein 18	↑	7.56	1.62E-02
O35217	Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1	↑	2.09	1.08E-02
O35448	Lysosomal thioesterase PPT2	↑	2.92	2.31E-04
O35701	Matrilin-3	↑	2.03	3.83E-02
O55111	Desmoglein-2	↑	2.50	2.48E-03
O88766	Neutrophil collagenase	↑	2.56	2.52E-02
O88879	Apoptotic protease-activating factor 1	↑	8.72	2.99E-02
P00687	Alpha-amylase 1	↑	1.62	2.24E-02
P00762	Anionic trypsin-1	↑	2.00	4.60E-02
P00787	Cathepsin B	↑	1.73	4.31E-02
P00884	Fructose-bisphosphate aldolase B	↑	1.80	1.65E-02
P01015	Angiotensinogen	↑	3.99	1.02E-02
P01132	Pro-epidermal growth factor	↑	2.25	4.18E-02
P01630	Ig kappa chain V-II region 7S34.1	↑	2.21	3.55E-02
P01635	Ig kappa chain V-V region K2 (Fragment)	↑	3.48	3.53E-03
P01830	Thy-1 membrane glycoprotein	↑	3.31	5.61E-03
P02761	Major urinary protein	↑	2.56	3.16E-02
P07151	Beta-2-microglobulin	↑	2.35	4.95E-03
P10605	Cathepsin B	↑	2.60	1.09E-02
P11276	Fibronectin	↑	1.76	4.43E-02
P13265	Glypican-3	↑	3.28	3.71E-02
P14562	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	↑	1.55	4.86E-02
P14630	Apolipoprotein M	↑	2.10	2.88E-02
P15978	Class I histocompatibility antigen, Non-RT1.A alpha-1 chain	↑	1.69	1.99E-03
P16675	Lysosomal protective protein	↑	2.06	1.12E-02
P19939	Apolipoprotein C-I	↑	12.05	3.09E-02
P20759	Ig gamma-1 chain C region	↑	4.55	3.31E-02
P20760	Ig gamma-2A chain C region	↑	1.63	5.63E-03
P20767	Ig lambda-2 chain C region	↑	2.51	2.10E-02
P27214	Annexin A11	↑	2.52	3.70E-02
P29534	Vascular cell adhesion protein 1	↑	2.45	2.17E-02
P30904	Macrophage migration inhibitory factor	↑	1.59	3.51E-02
P42854	Regenerating islet-derived protein 3-gamma	↑	3.40	1.24E-02
P43303	Interleukin-1 receptor type 2	↑	1.53	1.03E-02
P50430	Arylsulfatase B	↑	2.50	1.13E-03
P52590	Nuclear pore complex protein Nup107	↑	2.32	1.02E-02
P81827	Urinary protein 1	↑	3.07	3.43E-02

P81828	Urinary protein 2	↑	2.49	1.98E-02
P83121	Urinary protein 3	↑	2.14	1.54E-02
P84750	Ig kappa chain V region Mem5 (Fragment)	↑	1.54	3.96E-02
P84855	Major urinary protein (Fragments)	↑	3.59	9.71E-03
Q00238	Intercellular adhesion molecule 1	↑	2.03	1.87E-02
Q01177	Plasminogen	↑	1.57	3.99E-02
Q03146	Epithelial discoidin domain-containing receptor 1	↑	5.23	1.01E-02
Q05820	Putative lysozyme C-2	↑	2.07	2.08E-02
Q3TCN2	Putative phospholipase B-like 2	↑	2.41	3.63E-03
Q499T2	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase	↑	4.13	2.28E-02
Q4QQW8	Putative phospholipase B-like 2	↑	4.29	9.20E-03
Q60648	Ganglioside GM2 activator	↑	2.31	1.08E-02
Q62867	Gamma-glutamyl hydrolase	↑	1.59	3.54E-02
Q63257	Interleukin-4 receptor subunit alpha	↑	1.55	4.49E-02
Q641X3	Beta-hexosaminidase subunit alpha	↑	1.57	4.56E-02
Q64487	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta	↑	1.55	3.08E-02
Q66H12	Alpha-N-acetylgalactosaminidase	↑	1.85	3.49E-02
Q6AXR4	Beta-hexosaminidase subunit beta	↑	1.61	3.23E-02
Q6DGG1	Protein ABHD14B	↑	1.81	2.43E-02
Q6IRK9	Carboxypeptidase Q	↑	1.92	3.44E-02
Q6P7R8	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	↑	3.76	2.21E-03
Q7M6Z0	Reticulon-4 receptor-like 2	↑	1.84	1.64E-02
Q7TNR9	Rho guanine nucleotide exchange factor 4	↑	1.94	4.42E-02
Q80V42	Carboxypeptidase M	↑	1.82	1.72E-02
Q8BHC0	Lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1	↑	2.19	1.05E-02
Q8VCS0	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	↑	1.72	1.54E-02
Q9EQV6	Tripeptidyl-peptidase 1	↑	1.56	4.06E-02
Q9ET66	Peptidase inhibitor 16	↑	2.06	2、.37E-02
Q9WTR5	Cadherin-13	↑	1.80	4.32E-02
Q9WUK5	Inhibin beta C chain	↑	1.89	1.60E-02
Q9Z0J0	NPC intracellular cholesterol transporter 2	↑	2.50	1.26E-02
Q9Z339	Glutathione S-transferase omega-1	↑	3.17	9.92E-03

表 2 HXZQ-OL 组鉴定到的尿液差异蛋白

Table 2 The differential proteins identified in HXZQ-OL group.

Accession	Protein name	Trend	Fold change	P-value
A9UMV8	Histone H2A.J	↓	0.00	1.80E-02
P02301	Histone H3.3C	↓	0.00	3.24E-02
A2ARV4	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	↓	0.57	5.49E-03
G3V7W1	Programmed cell death protein 6	↓	0.58	3.12E-02
O55159	Epithelial cell adhesion molecule	↓	0.61	4.41E-02
O70417	Prolactin-inducible protein homolog	↓	0.40	4.99E-02
P02454	Collagen alpha-1(I) chain	↓	0.23	4.26E-02

P02781	Prostatic steroid-binding protein C2	↓	0.44	2.37E-02
P04692	Tropomyosin alpha-1 chain	↓	0.15	2.12E-02
P04764	Alpha-enolase	↓	0.61	4.03E-02
P11232	Thioredoxin	↓	0.58	1.09E-02
P11827	Beta-conglycinin alpha' subunit	↓	0.02	1.81E-02
P22282	Cystatin-related protein 1	↓	0.44	2.10E-02
P22283	Cystatin-related protein 2	↓	0.46	3.92E-02
P30120	Metalloproteinase inhibitor 1	↓	0.23	3.60E-02
P35704	Peroxiredoxin-2	↓	0.51	3.61E-03
P48500	Triosephosphate isomerase	↓	0.66	3.07E-02
P62804	Histone H4	↓	0.30	4.75E-03
Q5HZW5	CD320 antigen	↓	0.61	2.08E-02
Q63716	Peroxiredoxin-1	↓	0.49	4.59E-02
Q63751	Vomeromodulin	↓	0.19	2.59E-02
Q8BH70	F-box/LRR-repeat protein 4	↓	0.01	3.40E-02
Q9DBD0	Inhibitor of carbonic anhydrase	↓	0.55	3.32E-02
Q9QUR8	Semaphorin-7A	↓	0.65	2.74E-03
O88587	Catechol O-methyltransferase	↑	∞	8.64E-03
P11276	Fibronectin	↑	∞	6.35E-03
P19939	Apolipoprotein C-I	↑	∞	4.40E-02
P35441	Thrombospondin-1	↑	∞	1.89E-02
P49744	Thrombospondin-4	↑	∞	3.54E-03
O35206	Collagen alpha-1(XV) chain	↑	2.85	7.02E-03
O35217	Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1	↑	1.73	1.23E-02
O35448	Lysosomal thioesterase PPT2	↑	1.90	1.64E-02
O35701	Matrilin-3	↑	2.11	1.73E-02
O55111	Desmoglein-2	↑	1.69	2.38E-02
O70421	Frizzled-1	↑	2.50	4.94E-02
O88766	Neutrophil collagenase	↑	2.17	1.31E-04
P01132	Pro-epidermal growth factor	↑	2.56	2.06E-02
P01636	Ig kappa chain V-V region MOPC 149	↑	2.58	4.90E-02
P01830	Thy-1 membrane glycoprotein	↑	3.60	1.58E-02
P02650	Apolipoprotein E	↑	1.96	3.54E-02
P07314	Glutathione hydrolase 1 proenzyme	↑	1.90	2.17E-02
P08649	Complement C4	↑	1.54	1.28E-02
P18292	Prothrombin	↑	1.70	9.95E-03
P27214	Annexin A11	↑	1.73	2.03E-02
P30412	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	↑	2.16	2.73E-02
P41272	CD27 antigen	↑	1.60	1.09E-02
P42854	Regenerating islet-derived protein 3-gamma	↑	2.20	3.27E-02
P48199	C-reactive protein	↑	1.84	2.37E-03
P50430	Arylsulfatase B	↑	2.59	2.84E-02
P51635	Aldo-keto reductase family 1 member A1	↑	1.99	1.90E-02
P52796	Ephrin-B1	↑	1.80	3.40E-02
Q01279	Epidermal growth factor receptor	↑	1.68	3.17E-03
Q05793	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	↑	1.63	2.37E-03
Q3U2C5	E3 ubiquitin-protein ligase RNF149	↑	1.56	2.17E-03
Q5U1Y4	1,5-anhydro-D-fructose reductase	↑	1.89	4.87E-02
Q5ZQU0	Sushi, nidogen, and EGF-like	↑	1.61	3.05E-03

	domain-containing protein 1			
Q62867	Gamma-glutamyl hydrolase	↑	1.55	7.91E-03
Q64573	Liver carboxylesterase 1F	↑	2.57	1.43E-02
Q6AYT0	Quinone oxidoreductase	↑	2.34	1.60E-02
Q6AYT8	Myelin protein zero-like protein 1	↑	1.87	6.63E-03
Q6DGG1	Protein ABHD14B	↑	1.77	3.39E-02
Q8K182	Complement component C8 alpha chain	↑	3.29	2.77E-02
Q99PW3	Sialidase-1	↑	1.59	3.41E-02
Q9Z339	Glutathione S-transferase omega-1	↑	3.24	3.08E-02

2.2 尿液样本随机分组的结果

鉴于样本中鉴定出的蛋白质组学特征数量高于样本数量，两组之间的差异可能是随机产生的。开发了随机分组统计分析策略以确认这些差异蛋白是否由疾病引起。将 CDDP 组灌胃前样品（n=5）和灌胃后样品（n=5）共 10 个样本随机分成两组，在所有随机组合类型中，按照相同的筛选条件计算所有随机次数的平均差异蛋白数目为 20（见附表 1）。这些结果表明随机生成的差异蛋白为 20 个，筛选差异蛋白的可信度为 76% ，由此说明在目前的药物剂量下，尿蛋白质组并没有特别显著的变化，这可能和中药的作用温和有关。将 HXZQ-OL 组灌胃前后的尿液样本随机分成两组，同上操作，随机可能中筛选到的平均差异蛋白数目为 18（见附表 2）。

2.3 差异蛋白的功能注释

2.3.1 CDPP 组大鼠差异蛋白功能分析

使用 DAVID 数据库（https://david.ncifcrf.gov/）对 CDDP 组大鼠鉴定到的差异蛋白从生物学过程、细胞成分和分子功能三个方面进行功能富集分析（图 2）。从图中可以看出，这些差异蛋白主要参与了蛋白水解、肽基酪氨酸磷酸化的正向调控、一氧化氮生物合成的正向调控、粘多糖代谢、对乙醇的反应、神经节苷脂分解代谢等生物学过程。在细胞成分上，这些差异蛋白大多来自胞外和细胞质膜外，而在分子功能中，我们发现这些差异蛋白大多具有肽链内切酶活性、β-N-乙酰己糖胺酶、胶原蛋白绑定等功能。为了鉴定差异蛋白参与的主要代谢通路，进行了 KEGG 通路富集分析。结果显示，共有 8 个代谢通路被显著富集，其中包括鞘糖脂的生物合成、糖胺聚糖降解、动脉粥样硬化、糖酵解等。

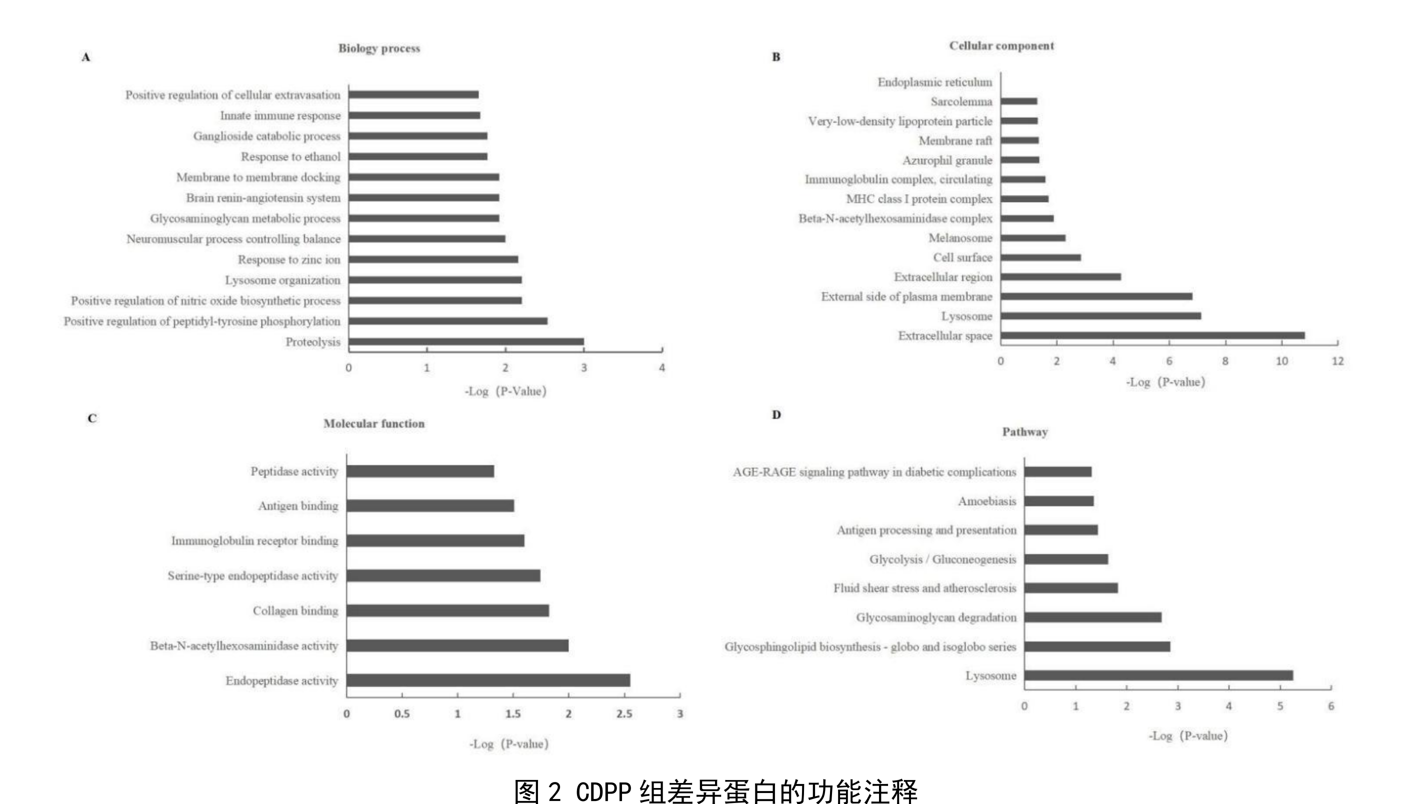


图 2 CDPP 组差异蛋白的功能注释

Figure 2 Functional enrichment analysis of differential proteins in the CDPP group. (A) Biological process. (B) Cellular component. (C) Molecular function. (D) Pathways.

2.3.2 HXZQ-OL 组大鼠差异蛋白功能分析

同上，我们通过功能分析发现（图 3），HXZQ-OL 组大鼠鉴定到的差异蛋白主要参与了骨化、巨核细胞分化的负调控、核小体组装、细胞氧化还原内稳态、急性期反应、内肽酶活性的负调控、细胞氧化解毒等生物学过程。在细胞成分上，这些差异蛋白仍旧是源于胞外区、细胞外基质；在分子功能中，差异蛋白主要具有钙离子结合、蛋白异二聚活性、硫氧还蛋白过氧化物酶活性、补体结合等功能。KEGG 通路富集分析。结果显示，共有 4 个代谢通路被显著富集，其中包括糖酵解、对酒精反应等。

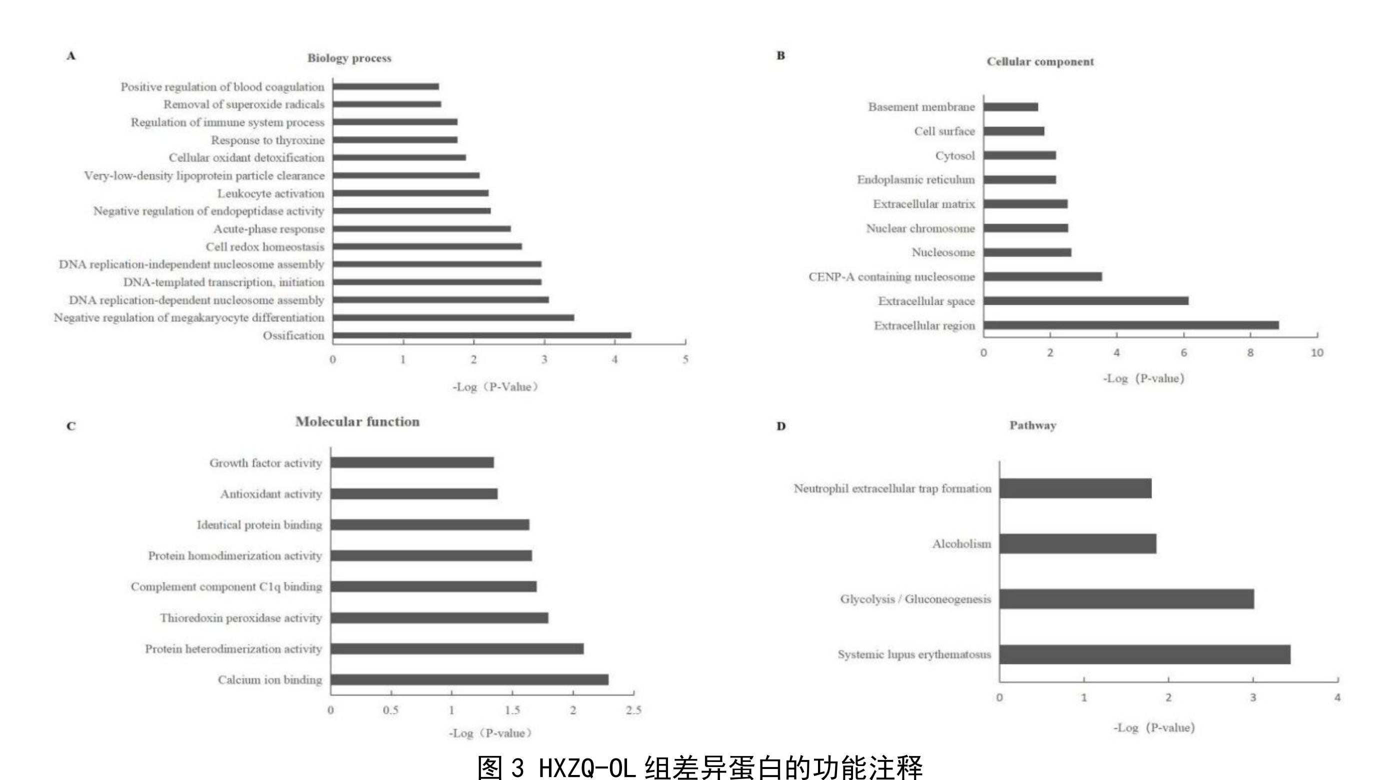


图 3 HXZQ-OL 组差异蛋白的功能注释

Figure 3 Functional enrichment analysis of differential proteins in the HXZQ-OL group. (A) Biological process. (B) Cellular component. (C) Molecular function. (D) Pathways.

3 讨论

本研究使用了两种常见中药分别建立了大鼠灌胃模型，通过对灌胃前后收集的尿液进行非标记 LC-MS/MS 质谱鉴定和分析，探究中药对大鼠尿蛋白的影响。统计分析结果显示，将灌胃后尿液和灌胃前尿液进行对比，在 CDPP 组灌胃模型中共鉴定到 84 个差异蛋白，在 HXZQ-OL 组灌胃模型中共鉴定到 64 个差异蛋白。非监督聚类结果显示 CDDP 灌胃 14 天前后的样品表现出明显差异，然而 HXZQ-OL 组灌胃 3 天前后的样品并不能显著区分，我们考虑是由于灌胃时间或者蛋白鉴定数目的限制导致了 HXZQ-OL 组灌胃前后的样品没有显著差异。这提示我们如果进一步观察中药对机体的影响，需要延长灌胃时间或者加大药物灌胃的剂量。同时我们也考虑到中药之所以副作用较小，是因为中药本身对机体的影响是十分微小的，从而才能起到微调的治疗效果。此外，以往研究在评估 CDDP 的治疗效果时发现，健康大鼠连续灌胃 28 天后对比其灌胃前后的心脏组织形态及血液生化指标并没有显著差异。[2]而我们的研究发现，尿蛋白质组可以显著区分 CDDP 组大鼠灌胃 14 天前后的样品，由此说明尿液蛋白质组可以早于组织形态变化表现出差异，体现了尿液的敏感性。

我们就 CDDP 组差异蛋白的生物学功能分析结果进一步检索相关资料发现一些生物过程和代谢通路与 CDDP 治疗心肌缺血的作用机制有关。当冠状动脉血流不足时会导致心肌缺血，从而使得代谢紊乱以及心肌细胞和机体的能量供应减少，因此代谢调节被认为是治疗缺血性心脏病的一种有效方法。[16]有研究通过血浆代谢组学技术发现 CDDP 可以缓解急性心肌缺血引起的代谢紊乱方面的功效，其中包括糖酵解和脂质代谢。[17]除此以外，也有研究结果表明 CDDP 具有明显的血管舒张作用，可以缓解心绞痛和调节动脉粥状硬化，其机制与介导血小板活化、cGMP-PKG 信号通路和血管平滑肌收缩有关。[18]因此，CDDP 在中国已被广泛用作硝酸甘油的补充剂，[19]用以改善冠状动脉粥样硬化性心脏病和心绞痛症状。

4 结论

本研究表明尿液蛋白质组学可以全面系统的反映中药对机体的整体影响。这提示我们尿液蛋白质组有潜力可以用于中药的药理研究，同时提供了一种创新性的研究中药功效的方法。

参考文献

[1] Liu X, Guo D-A. Application of proteomics in the mechanistic study of traditional Chinese medicine[J]. Biochemical Society transactions, 2011, 39(5):1348–1352.

[2] Xin X, Zou H, Zheng N, et al. Metabonomic strategy to the evaluation of chinese medicine compound danshen dripping pills interfering myocardial ischemia in rats[J]. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, 2013, 2013:718305.

[3] O'Brien K A, Ling S, Abbas E, et al. A chinese herbal preparation containing radix salviae miltiorrhizae, radix notoginseng and borneolum syntheticum reduces circulating adhesion molecules[J]. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, 2011, 2011:790784.

[4] Wang P, Sun H, Yang L, et al. Absence of an effect of T89 on the steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in healthy volunteers[J]. Journal of clinical pharmacology, 2014, 54(2):234–239.

[5] Wei X-H, Liu Y-Y, Li Q, et al. Treatment with cardiotonic pills(®) after ischemia-reperfusion ameliorates myocardial fibrosis in rats[J]. Microcirculation (New York, N.Y. 1994), 2013, 20(1):17–29.

[6] Guo J, Yong Y, Aa J, et al. Compound danshen dripping pills modulate the perturbed energy metabolism in a rat model of acute myocardial ischemia[J]. Scientific Reports, 2016, 6:37919.

[7] Zhao H-J, Guo L-P, Yang F-W, et al. Huoxiang Zhengqi formulas for treatment of gastrointestinal type cold：a systematic review and Meta-analysis[J]. Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica, 2017, 42(8):1495–1499.

[8] Cao H, Zhang A, Zhang H, et al. The application of metabolomics in traditional Chinese medicine opens up a dialogue between Chinese and Western medicine[J]. Phytotherapy research : PTR, 2015, 29(2):159–166.

[9] Wang L, Zhou G-B, Liu P, et al. Dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Realgar-Indigo naturalis as an effective treatment for promyelocytic leukemia[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(12):4826–4831.

[10] Gao Y. Urine-an untapped goldmine for biomarker discovery?[J]. Science China. Life sciences, 2013, 56(12):1145–1146.

[11] Paul P, Antonydhason V, Gopal J, et al. Bioinformatics for Renal and Urinary Proteomics: Call for Aggrandization[J]. International journal of molecular sciences, 2020, 21(3).

[12] Wu J, Gao Y. Physiological conditions can be reflected in human urine proteome and metabolome[J]. Expert review of proteomics, 2015, 12(6):623–636.

[13] Wiśniewski J R, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis[J]. Nature methods, 2009, 6(5):359–362.

[14] Wang S, Zheng W, Hu L, et al. MixProTool: A Powerful and Comprehensive Web Tool for Analyzing and Visualizing Multigroup Proteomics Data[J]. Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology, 2018, 25(10):1123–1127.

[15] Huang D W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources[J]. Nature protocols, 2009, 4(1):44–57.

[16] Lopaschuk G D, Ussher J R, Folmes C D L, et al. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease[J]. Physiological reviews, 2010, 90(1):207–258.

[17] Aa N, Guo J-H, Cao B, et al. Compound danshen dripping pills normalize a reprogrammed metabolism of myocardial ischemia rats to interpret its time-dependent efficacy in clinic trials: a metabolomic study[J]. Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society, 2019, 15(10):128.

[18] Wu X, Han X, Li L, et al. iTRAQ-based quantitative proteomics and target-fishing strategies reveal molecular signatures on vasodilation of Compound Danshen Dripping Pills[J]. Chemico-Biological Interactions, 2020, 316:108923. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279719311238.

[19] Jia Y, Huang F, Zhang S, et al. Is danshen (Salvia miltiorrhiza) dripping pill more effective than isosorbide dinitrate in treating angina pectoris? A systematic review of randomized controlled trials[J]. International journal of cardiology, 2012, 157(3):330–340.